

125  
2es



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**COMPARACION DE LAS TECNICAS BACTERIOLÓGICAS Y  
DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN LA DETECCIÓN DE  
*Actinobacillus pleuropneumoniae* DE PULMONES DE  
CERDOS SACRIFICADOS EN RASTRO**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**  
**PRESENTA:**  
**RIGOBERTO HERNANDEZ CASTRO**

ASESORES:

- MVZ., MSc. José Angel Gutiérrez Pabello
- MVZ., Ph. D. Gilberto Chávez Gris
- MVZ. Elda Jiménez Guerra



MEXICO, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS BACTERIOLÓGICAS Y DE  
INMUNOHISTOQUÍMICA EN LA DETECCIÓN DE *Actinobacillus  
pleuropneumoniae* DE PULMONES DE CERDOS SACRIFICADOS EN RASTRO**

Tesis presentada ante la  
División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
de la  
Universidad Nacional Autónoma de México  
para la obtención del título de  
Médico Veterinario Zootecnista  
por:

**RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO**

**Asesores: MVZ., MSc. José Angel Gutiérrez Pabello  
MVZ., Ph. D. Gilberto Chávez Gris  
MVZ. Elda Jiménez Guerra**

**MÉXICO, D.F.**

**1995**

## **DEDICATORIA**

**A mis padres: Ismael Hernández Vanegas  
Ascención Castro Ríos**

**Por toda su confianza depositada en mí y por esa manera en que viven la vida.**

**A mis hermanos: Gicela Hernández Castro  
Esperanza Hernández Castro  
Angel Hernández Castro  
Ismael Hernández Castro  
Alfredo Hernández Castro  
Oswaldo Hernández Castro  
Sandra Hernández Castro  
Xochitl Hernández Castro**

**A mis sobrinos: Gicela, David, Ivan, Kika, Kelly, Bryan y Mara  
Por todo su apoyo y cariño.**

**A mi tío: J. Guadalupe Hernández, por estar siempre cerca de mí**

**A: G. Carlos Montañez, por su gran amistad**

**A todos aquellos familiares y amigos que aunque no están en esta lista están en mi mente.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México**

**A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Al Departamento de Microbiología e Inmunología**

**A mis asesores: Por todo su tiempo, paciencia y conocimientos que compartieron conmigo.**

**Al MVZ., M Sc. J. Ángel Gutiérrez Pabello: Por todo su apoyo y por creer en mí.**

**Al Dr. Gilberto Chávez Gris: Por su ayuda y amistad incondicional.**

**Al Dr. Antonio Verdugo: Por todos sus consejos para la realización de este trabajo.**

**Al Técnico: Luis A. Morales A.: Por todo su tiempo empleado en este trabajo.**

**A todos mis maestros que intervinieron en mi formación.**

## CONTENIDO

**página**

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>12</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>19</b>
<b>CUADROS.....</b>	<b>25</b>
<b>FIGURAS.....</b>	<b>30</b>

## **CONTENIDO**

**página**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>12</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>19</b>
<b>CUADROS.....</b>	<b>25</b>
<b>FIGURAS.....</b>	<b>30</b>

## RESUMEN

Hernández Castro Rigoberto. Comparación de las técnicas bacteriológicas y de inmunohistoquímica en la detección de *Actinobacillus pleuropneumoniae* de pulmones de cerdos sacrificados en rastro. Bajo la dirección de MVZ. J. Angel Gutiérrez Pabello, MVZ. Gilberto Chávez Gris y MVZ. Elda Jiménez Guerra.

En el presente trabajo se comparó la técnica de aislamiento bacteriológico con el método de inmunohistoquímica (IHQ) con la variedad del complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC-P) para el diagnóstico de la pleuroneumonía contagiosa porcina. Se utilizaron cien pares de pulmones de cerdos sacrificados en rastro, 50 con lesiones macroscópicas aparentes y 50 sin lesiones macroscópicas, a los cuales se les realizó examen postmortem, histopatología, bacteriología e inmunohistoquímica.

Se lograron identificar once casos positivos (11%) al aislamiento bacteriológico, de los cuales nueve correspondieron a pulmones con lesiones neumónicas y los dos restantes a pulmones sin lesiones macroscópicas. De los pulmones con lesiones solo 4 (4%) mostraron lesiones típicas de pleuroneumonía, mientras que en 6 pulmones (6%) se encontraron lesiones microscópicas de pleuroneumonía del 100% de los pulmones. Entre las lesiones microscópicas predominantes se consideraron a la neumonía intersticial (20%), bronconeumonía supurativa (14%) y bronconeumonía no supurativa (6%).

Para la técnica de IHQ se produjo suero hiperinmune en conejo contra *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, el cual alcanzó un título de 1:1280 mediante el método de hemaglutinación indirecta (HI). Para estandarizar la técnica de IHQ se utilizaron diferentes diluciones, siendo 1:1500 la dilución óptima. La técnica logró identificar positividad en 75 casos (75%).

Se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.001$ ) entre los resultados obtenidos por ambas pruebas. Posiblemente la observación de una mayor positividad mediante la técnica de IHQ se debió a la poca sensibilidad del aislamiento bacteriano en casos crónicos, tratamientos terapéuticos a edad temprana, contaminación de muestras y la presencia de flora normal del aparato respiratorio alto que dificultan el aislamiento del microorganismo.

El método de inmunohistoquímica (ABC-P) que se describe ofrece mejores resultados que el aislamiento bacteriano, pudiéndose utilizar como una herramienta más en el diagnóstico de rutina de infecciones por *A. pleuropneumoniae*.

## INTRODUCCIÓN

### Características generales.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) es el agente etiológico de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP). Este microorganismo es un pequeño cocobacilo Gram negativo que mide aproximadamente de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de largo por 0.3  $\mu\text{m}$  de ancho, no forma esporas, es capsulado, no es móvil, requiere para su crecimiento el factor V o NAD (Dinucleótido de Adenina y Nicotinamida) y es aerobio y anaerobio facultativo (2, 3, 17).

Tomando en consideración los estudios realizados sobre las propiedades fenotípicas y de homología del ADN de estas bacterias, a *Haemophilus pleuropneumoniae* se le transfirió al género *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1 dependiente de NAD y a *Pasteurella haemolytica like* al género y especie *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 2 independiente de NAD. El biotipo 1 integra 12 serotipos mientras que el biotipo 2 abarca 2 serotipos, la especificidad del serotipo se basa en la composición del antígeno capsular (39).

Esta bacteria posee varios factores de virulencia, tales como: tres tipos diferentes de hemolisinas o citolisinas, un complejo de proteínas de membrana externa, lipopolisacáridos endotóxicos (LPS), cápsula, plásmidos, factores de colonización como son las fimbrias citoadherentes, una exotoxina conocida como pleurotoxina, el factor de permeabilidad y la secreción de proteasas (4, 12, 23, 24, 25, 32, 39).

### Epizootiología.

El único huésped susceptible a *A. pleuropneumoniae* es el cerdo. El agente no es considerado comensal de la flora normal del cerdo, por lo tanto se localiza en vías respiratorias de animales enfermos y animales que se recuperaron de la infección considerados como portadores asintomáticos. Estos individuos aparentemente sanos

conservan a la bacteria en las tonsilas, la mucosa respiratoria y los abscesos pulmonares, siendo susceptibles a desarrollar la enfermedad clínica bajo condiciones de estrés, convirtiéndose así en la fuente de diseminación de la enfermedad (3, 12, 16, 17)

La PCP se encuentra ampliamente distribuida en todo en mundo, se ha descrito en Inglaterra, Argentina, E.U.A., Canadá, Suiza, Holanda, Dinamarca, Australia, Finlandia, Japón, Rumania, Corea, Brasil, Venezuela, España, Taiwán, Alemania, Suecia, Bélgica, Francia y México. En México se ha identificado la presencia de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 del biotipo 1 en diferentes regiones de la República; sin embargo, los serotipos que con mayor frecuencia se detectan son el 1 y el 5. El serotipo 1 es considerado responsable de los brotes más severos de pleuroneumonía en el campo (6).

La enfermedad es considerada como uno de los principales problemas respiratorios del ganado porcino, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas derivadas de las altas tasas de morbilidad (100%) y mortalidad (20-80%), gastos en tratamientos terapéuticos, así como un pobre índice de conversión alimenticia provocando que los animales requieran de varias semanas más para alcanzar el peso de mercado. La pérdida por muerte puede ocurrir en cualquier momento del ciclo productivo, pero generalmente se observa en etapas de crecimiento y engorda, en animales con un peso de 30 a 50 Kg aproximadamente (4).

#### **Signos y lesiones.**

La enfermedad clínica tiene tres presentaciones diferentes sobreaguda, aguda y crónica. Para la fase sobreaguda el único signo es muerte súbita, en tanto que para la etapa aguda, la muerte puede presentarse en 3 ó 4 días acompañada de anorexia, fiebre, cianosis de mucosas, disnea, tos, vómitos ocasionales y postración. El daño respiratorio puede ser tan severo que los cerdos afectados respiran por el hocico adoptando una posición de perro sentado inclusive poco antes de la muerte puede haber una descarga abundante de espuma sanguinolenta por el hocico y las fosas nasales.

En relación a la presentación crónica o de portador asintomático no existe una signología específica pero es posible detectar disminución en el índice de conversión alimenticia y, en consecuencia, disminución en la ganancia de peso (12, 14, 16, 17, 40).

A la necropsia, las lesiones macroscópicas que se pueden observar se restringen a la cavidad torácica, en donde se logra visualizar pulmones de color azul violáceo, zonas de neumonía fibrino-hemorrágica con distintos grados de desarrollo, así como pleuritis serofibrinosa, donde se pueden apreciar zonas circunscritas con una capa de fibrina formando adherencias entre los lóbulos pulmonares y la pared torácica. Además, es posible distinguir abscesos caseosos diseminados en el parénquima y en la superficie pulmonar. Se ha observado que las áreas pulmonares más comúnmente afectadas corresponden a las regiones media y dorsal de los lóbulos diafragmáticos (6, 9, 16, 20, 41)

En tanto que los estudios histopatológicos muestran una pleuroneumonía fibrinosa hemorrágica, congestión, hemorragias subpleurales, alveolares e intraseptales, exudado fibrinoso en capilares y luz alveolar, así como una intensa infiltración de células mononucleares y la distensión de septos interlobulillares. Esta última lesión es atribuida a la acción de la fibrina y el edema. Otro hallazgo característico es la presencia de gran cantidad de células alargadas formando acúmulos, estas células han sido interpretadas como macrófagos transformados por el efecto de las toxinas bacterianas (6, 44).

#### **Diagnóstico.**

El diagnóstico de infecciones por *A. pleuropneumoniae* se fundamenta en la historia de hato, signos clínicos y lesiones macroscópicas. El diagnóstico clínico y el examen a la necropsia adquieren de esta forma un carácter presuntivo, por lo que se requiere del aislamiento bacteriológico y la serotipificación para la identificación del agente causal.

Debido a que los 12 serotipos presentan propiedades morfológicas y bioquímicas idénticas, es importante la caracterización completa del microorganismo, ya que existen diferencias relacionadas con la virulencia entre los serotipos conocidos (36, 41).

La serotipificación se lleva a cabo mediante diversos métodos, siendo la Hemoaglutinación Indirecta (HI) una de las técnicas más confiables, aunque recientemente se ha descrito el uso de Inmunoensayos Enzimáticos (ELISA) utilizando anticuerpos monoclonales y la Reacción en Cadena de la Polimerasa "PCR" (19, 26, 34).

La importancia del aislamiento e identificación del serotipo radica en la ayuda que proporciona en el análisis epidemiológico y en la selección de la bacterina más efectiva, ya que la protección que confiere la vacunación depende del serotipo que esté presente en la zona afectada. Otra ayuda del aislamiento es determinar la sensibilidad a los quimioterapéuticos, esta información es de gran importancia debido a que el número de cepas resistentes continúa en aumento debido al uso indiscriminado de los antibióticos (6, 11).

El aislamiento y la serotipificación presentan la desventaja de consumir mucho tiempo, que aunque ofrecen buenos resultados de las muestras procedentes de casos agudos y sobreagudos, en los casos de presentaciones crónicas se ha revelado como un método poco sensible, ya que el aislamiento de la bacteria es muy difícil a partir de órganos lesionados debido al crecimiento excesivo de bacterias contaminantes, flora normal de aparato respiratorio alto, por lo que es necesario recurrir a alternativas más rápidas y sensibles para los casos crónicos (16).

Los exámenes histopatológicos son útiles para diferenciar lesiones producidas por otros microorganismos, que se sabe aumentan la severidad de la enfermedad clínica causada por *A. pleuropneumoniae* (11).

Las pruebas serológicas desempeñan un papel importante en la identificación de portadores asintomáticos, que son individuos causantes de la transmisión y diseminación de la enfermedad entre los hatos.

La base de las pruebas serológicas es la detección de anticuerpos en el suero y otros fluidos corporales teniendo grandes ventajas como el poder trabajar con animales vivos y detectar portadores sanos (38).

Existe una gran cantidad de métodos como lo son: aglutinación en tubo, aglutinación en placa, aglutinación en tubo con 2 mercapto-etanol, aglutinación con partículas de látex, hemoaglutinación indirecta, fijación del complemento, ELISA, neutralización de hemolisina, radioinmunoanálisis e inmunotransferencia o "Western blot" (10, 13, 27, 28, 30, 31, 43).

Sin embargo, pese a que se cuenta con numerosos ensayos serológicos para el diagnóstico de la PCP, algunos de estos métodos han caído en desuso y otros no son capaces de diferenciar anticuerpos vacunales de anticuerpos infecciosos, complicando así el diagnóstico definitivo.

Otra opción en el diagnóstico de la PCP son las técnicas inmunológicas directas, cuyo principio es la detección de restos antigénicos a partir de muestras frescas, congeladas o incluidas en bloques de parafina, métodos como Coaglutinación, Inmunofluorescencia, ELISA e Inmunohistoquímica "IHQ" (20, 29, 33, 37).

Las técnicas de Coaglutinación, ELISA e Inmunofluorescencia son técnicas rápidas, sensibles y específicas que nos permiten confirmar otros métodos diagnósticos utilizando material antiguo con la desventaja de requerir equipo especial, costoso y personal calificado. La técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) presenta tres variedades: Peroxidasa-Antiperoxidasa (PAP), Estreptavidina-Biotina (EB) y el Complejo Avidina-Biotina (ABC).

### **Técnica de inmunohistoquímica (IHQ)**

El uso de esta técnica en el diagnóstico comprende la identificación de enfermedades asociadas a autoanticuerpos, tumores, deposición de complejos inmunes, hormonas, enzimas, superficies celulares y en la detección de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas como bacterias, virus, hongos y parásitos (15, 22, 45, 46).

El complejo Avidina-Biotina (ABC) se basa en la afinidad de la Avidina, que es una proteína de la clara del huevo para unirse con la vitamina Biotina. La técnica de ABC es un método indirecto, ya que se utiliza un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario ligado a la biotina, la cual reconoce específicamente a la avidina, que se encuentra conjugada con la enzima peroxidasa, finalmente se añade un sustrato que desarrolla una coloración que indica la presencia del antígeno localizado por el anticuerpo primario. Las preparaciones de IHQ requieren de un microscopio de luz ordinaria para poder visualizar las tinciones. Los epítopes antigénicos no son destruidos por la fijación de la formalina, por la inclusión en parafina ni por la congelación, favoreciendo su uso en estudios de distribución de antígenos en tejidos afectados y su correlación con los cambios histopatológicos (1, 7, 21, 42).

Dentro de las ventajas de la IHQ están el poder trabajar con improntas, frotis (Inmunocitoquímica) y preparaciones para microscopía electrónica, además de detectar varios antígenos en una sola preparación, contar con gran sensibilidad y especificidad, ser un ensayo rápido, sencillo y susceptible a automatizarse (18).

## **HIPÓTESIS**

La técnica de Inmunohistoquímica (ABC) logrará identificar un porcentaje mayor de portadores asintomáticos que no son detectables por métodos rutinarios como el aislamiento bacteriológico.

## **OBJETIVOS**

Estandarizar la técnica de IHQ (ABC) para el diagnóstico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1.

Evaluar la utilidad del método de IHQ para el diagnóstico rutinario de la PCP comparando sus resultados con el aislamiento bacteriano.

## MATERIAL Y MÉTODOS

1. **Muestras:** Se seleccionaron 100 pares de pulmones de cerdos sacrificados en rastro, 50 pares con lesiones de neumonía y 50 pares sin lesiones macroscópicas aparentes, de las muestras consideradas con lesiones se realizó una clasificación de estos cambios considerándose los siguientes: congestión, hemorragias, adherencias, pleuritis, abscesos, consolidación.
2. **Aislamiento bacteriológico:** Se inculó una caja de Agar sangre y se cruzó con una cepa de *Staphylococcus aureus* para proveer el Factor V. Las cajas se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de microaerobiosis. La identificación de los microorganismos se llevó a cabo con técnicas bacteriológicas para *A. pleuropneumoniae* (16).
3. **Estudio Histopatológico:** Las muestras de tejido pulmonar seleccionadas fueron fijadas en formalina amortiguada (pH 7.2) al 10% y procesadas con la técnica de inclusión en parafina para su posterior corte de 5 micras de grosor, las cuales se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E)
4. **Producción de antisuero primario contra *A. pleuropneumoniae* serotipo 1:** Se utilizaron tres conejos hembras de la raza Nueva Zelanda con un peso de 2 Kg y 3 meses de edad, se sometieron a una hiperimmunización de 9 semanas. El antígeno utilizado fue *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 cepa aislada de un caso clínico, que se serotipificó por la técnica de hemoaglutinación indirecta y se sembró en TSA enriquecido con NAD al 0.1%. El cultivo de 16 horas fue cosechado en PBS pH 7.2 e inactivado con formalina al 0.3% a temperatura ambiente.

La determinación de la concentración final del inóculo se llevó a cabo por observación a la escala número 1 del nefelómetro de Mac Farland.

5. **Estandarización de la técnica de Inmunohistoquímica.** Se utilizó el equipo comercial Vectastain ABC (Rabbit IgG) El anticuerpo policlonal primario empleado fue producido en conejo, mientras que como anticuerpo secundario biotinilado se utilizó una Anti-IgG de conejo producido en cabra. Posteriormente se utilizó el complejo ABC-Peroxidasa para detectar la reacción y como cromógeno a la Diaminobenzidina. Como control positivo se utilizó una sección de tejido pulmonar de cerdo inoculado experimentalmente con *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 y como control negativo se realizó la IHQ de forma rutinaria sustituyendo el anticuerpo primario por suero normal de conejo. Se probaron las siguientes diluciones del suero hiperimmune utilizado: 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:1500 y 1:2000.

6. **Análisis estadístico:** Se utilizó el análisis de Ji-cuadrada para determinar diferencias estadísticas significativas entre la IHQ y el aislamiento bacteriano.

## **RESULTADOS**

### **AISLAMIENTO BACTERIANO.**

De un total de 100 pares de pulmones de cerdo procedentes de 4 estados de la República Mexicana: Querétaro (25), Jalisco (8), Edo. de México (43) y Sonora (24) se observó un total de 11 casos positivos al aislamiento de *A. pleuropneumoniae* que correspondieron al 11%. De éstos, 9 fueron del grupo de 50 pares de pulmones con lesiones neumónicas que equivalen a un 18%; mientras que los otros 2 aislamientos fueron de los 50 casos sin lesiones aparentes, lo cual corresponde al 4%. La identificación de *A. pleuropneumoniae* se realizó con base en pruebas bioquímicas y de cultivo.

### **CAMBIOS ANATOMOPATOLÓGICOS.**

Se evaluó la extensión y apariencia de las lesiones de los 100 pares de pulmones, agrupándolos en 50 pares con lesiones aparentes de neumonía (figura 1) y 50 sin lesiones macroscópicas aparentes (figura 2). De estos se tomaron muestras para los estudios bacteriológicos, histopatológicos y de inmunohistoquímica.

De los 50 pares de pulmones con lesiones neumónicas, 38 mostraron una coloración rojo púrpura de forma irregular con tamaño y distribución variable. En 21 se observaron amplias zonas de hemorragias en la parte dorsal de los lóbulos diafragmáticos; 21 con presencia de consolidación; 21 con pleuritis en donde los septos interlobulares se presentaron muy aparentes y de aspecto hialino; en 17 se observó edema; 15 mostraron adherencias entre los lóbulos pulmonares y la cavidad torácica; y por último, 9 presentaron abscesos diseminados en el parénquima y superficie pulmonar (cuadro 1).

## **ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.**

Los cambios microscópicos encontrados en los pulmones, con y sin lesiones, fueron las siguientes: congestión, edema, hemorragias alveolares y subpleurales, necrosis, enfisema, engrosamiento de septos, pleuritis, trombos de fibrina, exudado en bronquios y bronquiolos, presencia de macrófagos y polimorfonucleares e hiperplasia linfoide peribronquial. Las lesiones microscópicas más frecuentes fueron: neumonía intersticial en un 20%, bronconeumonía supurativa severa difusa en un 14%, pleurobronconeumonía no supurativa severa difusa en un 6%, bronconeumonía crónica severa en un 4%, pleuroneumonía fibrosa crónica en un 3%, bronconeumonía supurativa severa difusa en un 2% y bronquitis granulomatosa, bronquitis activa crónica, neumonía no supurativa y pleuroneumonía supurativa severa difusa en un 1% en cada caso (cuadro 2).

## **PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO PRIMARIO.**

Después de 9 semanas de inoculaciones se sangraron a los 3 conejos y se titularon los sueros obtenidos por medio de la técnica de hemoaglutinación indirecta (HI), alcanzando sólo en uno de los conejos títulos de 1:1280, por lo que se le realizó sangría en blanco.

Los otros 2 conejos se continuaron inoculando por 2 semanas más con un inóculo de bacterias vivas (3 ml por inóculo / 2 veces por semana). Al término de esta última inoculación se descansaron por una semana y se realizó sangría en blanco. Los sueros se titularon por HI alcanzando un título de 1:1280 (cuadro 3).

El suero recolectado fue filtrado con membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore), se inactivaron durante media hora a 56°C y fue almacenado a -70°C.

## **TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA.**

Después de probar las diferentes diluciones del suero hiperinmune y determinar que la concentración óptima fue de 1:1500 se realizó la técnica de IHQ en forma rutinaria a todas las muestras pulmonares recolectadas.

El antígeno o restos antigénicos de *A. pleuropneumoniae* se observaron teñidos de color café-oscuro. Se lograron visualizar resultados positivos en 75% del total de los pulmones trabajados, de estos casos, 43 correspondieron al grupo de pulmones con lesiones de neumonía y 32 a muestras de pulmones sin lesiones macroscópicas aparentes (cuadro 4).

El antígeno fue observado en forma cocobacilar, agrupado en pequeños racimos o en forma individual, lográndose encontrar en el interior de los vasos sanguíneos, bronquios y bronquiolos, en el citoplasma de macrófagos alveolares (figura 5), septos y espacios alveolares (figura 3), luz alveolar (figura 4) y en algunos casos se observó una fuerte reacción positiva en glándulas bronquiales.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Para realizar el estudio estadístico de Ji-cuadrada se utilizó el paquete comercial Stat-view. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados del aislamiento bacteriano y la técnica de IHQ (ABC-P) ( $P \leq 0.001$ ), habiendo utilizado el intervalo de confianza para 2 proporciones con una confiabilidad de 95% (cuadro 5).

## DISCUSIÓN

La finalidad de este estudio fue evaluar la eficacia de la técnica de inmunohistoquímica, variedad complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC-P) comparada con el aislamiento bacteriano para la detección de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. El presente estudio es el primero de este tipo realizado en México, utilizando *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, biotipo 1; se trabajó con el serotipo 1, por ser el más frecuentemente aislado en México, además de ser el responsable de los brotes más severos de pleuroneumonía en el campo (6).

Al respecto, la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) logró detectar 75 casos positivos correspondientes al 75% mientras que con el aislamiento bacteriano únicamente se detectaron 11 casos positivos equivalentes al 11%, lo cual no coincide con los trabajos llevados a cabo por Ibarгойén y Col. (1989), Ohishi y Col. (1986), Gutiérrez y Col. (1993), los cuales reportaron porcentajes de 100% para IHQ y 95% para el aislamiento bacteriano. No obstante, se debe señalar que estos estudios fueron realizados utilizando un modelo de inoculación experimental, mientras que en el presente trabajo los porcentajes fueron menores, lo cual puede atribuirse a que en nuestro caso se trabajaron muestras de cerdos sacrificados en rastro.

Los resultados de ambas pruebas fueron contrastantes, ya que para el método de IHQ se determinó un 75% de positividad, mientras que para el aislamiento bacteriano se observó solo un 11%; dichos resultados se analizaron estadísticamente encontrando diferencias significativas ( $P < 0.001$ ), por lo que puede ser recomendable la utilización de la técnica de IHQ en el diagnóstico de la pleuroneumonía contagiosa porcina.

Un aspecto interesante de los resultados obtenidos, corresponde a los pulmones procedentes del estado de Sonora (Cuadro 4) en donde se observó un menor número de aislamientos y un mayor número de resultados positivos a IHQ correspondiendo a cero aislamientos y 15 IHQ positivos, de un total de 24 muestras. El hecho de no haber encontrado ningún aislamiento en el estado de Sonora, pudiera atribuirse a diversos factores como el nivel de tecnificación de las granjas en esa región de México, prácticas de manejo como lo sería la medicación temprana al destete que disminuye, mas no elimina, a *A. pleuropneumoniae* impidiendo el aislamiento, así como campañas de control y erradicación de enfermedades como la enfermedad de Aujeszky que facilita la presentación de la PCP. Asimismo, el haber encontrado un mayor porcentaje de resultados positivos mediante IHQ, podría deberse a que el suero primario empleado presentara una reacción cruzada con otras bacterias de la misma familia (*Pasteurella*, *Haemophilus*) e inclusive con otros serotipos de *A. pleuropneumoniae*, sobre todo si se considera que el serotipo 1 tiene reacción cruzada con los serotipo 9 y 11. Es por lo anteriormente expuesto que se sugiere realizar la misma prueba de IHQ sobre tejidos infectados con estas bacterias o la utilización de anticuerpos monoclonales para descartar estas posibles interferencias en el diagnóstico de la PCP.

Los resultados del aislamiento bacteriano mostraron que de un total de 100 pares de pulmones de cerdo sacrificados en rastro, sólo 11 muestras (11%) resultaron positivas al aislamiento bacteriológico. Estos hallazgos son similares a los descritos en diversos trabajos por Ciprian y Col. (1988), Diaz y Col. (1989), Freese, W. (1990). Al respecto, se sugiere que los problemas presentados para el aislamiento bacteriológico en el diagnóstico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se debe a la presencia de bacterias contaminantes, flora normal del aparato respiratorio alto y de infecciones mixtas con otros microorganismos tales como *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*,

*Haemophilus parvus* y *Streptococcus suis*, haciendo del aislamiento bacteriológico un método poco sensible para los casos crónicos de pleuroneumonía contagiosa porcina.

En el estudio postmortem, de los 50 pares de pulmones que mostraron lesiones neumónicas macroscópicas únicamente 4 de ellos (8%) presentaron lesiones del tipo de PCP, como la es una neumonía fibrino-hemorrágica y pleuritis serofibrinosa (4, 8), considerando a estas lesiones como características de infecciones por *A. pleuropneumoniae*. De estos 4 pulmones con lesiones de pleuroneumonía se logró el aislamiento de *A. pleuropneumoniae*; mientras que los otros 5 aislamientos se obtuvieron de pulmones con lesiones de tipo mixto, que macroscópicamente mostraban áreas de consolidación, hemorragias y pleuritis. Por otra parte, los otros 2 casos positivos al aislamiento fueron identificados de pulmones sin lesiones macroscópicas aparentes. De esta manera, según se observó, las lesiones asociadas a infecciones crónicas por *A. pleuropneumoniae* no muestran, necesariamente, un patrón de lesiones definidas que pudieran caracterizarlos, a diferencia de los procesos de tipo agudo.

Las lesiones histopatológicas evidenciaron que solamente en el 6% de los pulmones se observaron lesiones compatibles con pleuroneumonía contagiosa porcina, caracterizadas por congestión, hemorragias subpleurales, exudado fibrinoso en luz alveolar y una fuerte infiltración de células mononucleares, siendo todos estos casos positivos a infecciones por *A. pleuropneumoniae* mediante IHQ y, en contraste, sólo 2 de éstos fueron positivos al aislamiento bacteriano. Los aislamientos bacterianos restantes se obtuvieron de lesiones como neumonía intersticial en 2 casos, pleuritis no supurativa en 2 casos, neumonía no supurativa y bronquitis crónica en un caso y 3 más de cuadros con presencia de hemorragias, congestión y edema. Estos resultados difieren de los estudios realizados por otros autores Ciprián y Col. (1994), Dider y Col. (1984), Gutiérrez y Col. (1990), en los cuales se evalúan lesiones producidas por infecciones experimentales

Estas discrepancias las podemos atribuir a que en los casos de infección natural de tipo crónico, se presentan infecciones mixtas por la interacción de otros agentes infecciosos como bacterias, parásitos y virus, lo cual modifica el curso y las lesiones que presentan estos animales.

Con respecto a la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica (IHQ), se produjo suero hiperinmune en conejo en contra de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1. El título obtenido fue de 1:1280 por la técnica de hemoaglutinación indirecta (HI), concordando con el obtenido por Gutiérrez y Col. (1990). Con este suero hiperinmune se realizaron diferentes diluciones para estandarizar la técnica de IHQ, encontrando una dilución óptima de trabajo de 1:1500, lo cual se asemeja a lo realizado por otros autores en diferentes partes del mundo (Ibargoyén y Col. (1989), Ohishi y Col. (1986), Gutiérrez y Col. (1993).

De los resultados observados en este estudio se podría sugerir la utilización de la técnica de inmunohistoquímica (ABC-P) como una prueba tamiz para el diagnóstico de la pleuroneumonía contagiosa porcina acompañada de otras pruebas tales como las serológicas e inmunotransferencia, para conocer el estado real de las granjas con respecto a *Actinobacillus pleuropneumoniae* y poder así llevar a cabo medidas de control y erradicación de la enfermedad.

## LITERATURA CITADA

- 1 - Bourne, J. A. Handbook of immunoperoxidase staining methods. *Dako corporation*. Immunochemistry laboratory.
- 2 - Bunka, S., Muller, E., Petzoldt, K. Direct detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* in lungs of pigs. *Proc 10h Ipvv Congr.* Rio de Janeiro, Brazil. 71. 1988.
- 3 - Carter, G. R. and Chengappa, M. M.: Essentials of Veterinary Bacteriology. 4th edition. *Lea & Febeger*. Philadelphia. 1991.
- 4 - Ciprian, C. A., Colmenares, C. G. y Mendoza, E. S. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: La enfermedad en México. (1). *Sintesis porcina*. 9: 34-40. 1990.
- 5 - Ciprian, C. A., Medina, G., Fuentes, M., Pijoan, C., Torres, O., Colmenares, G. y Camacho, J.: Serotipificación de *Haemophilus pleuropneumoniae* aislados de cerdos en México. *Vet Mex.* (19) 205-210. 1988.
- 6 - Ciprian, C. A., Mendoza, E. S.: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, agente responsable de la pleuroneumonía contagiosa porcina. *Primer ciclo nacional de afecciones respiratorias del cerdo*. Mérida, Yucatán. 1994.
- 7 - De Lellis, R. A., Sternberg, L. A., Mann, R. B., Banks, P. M., and Nakane, P. K. Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. *A J C P*. 71: 483-488. 1979.
- 8 - Diaz, C., González, J., Stephano, A.: Identificación de diferentes serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* aislados en México de cerdos con pleuroneumonía de 1985-1988. *Vet Mex.* 20: 157-159. 1989.
- 9 - Dider, P. J., Perino, L. and Urbance, J.: Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. Microbiological and Pathologic finding. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 184: 716-719. 1984.

- 10.- Fenwick, B., Smeltzer, S. M. and Viker, K. Development and evaluation of a serum hemolysis neutralization assay for the diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Proceeding of the 70th conference of research workers in animal disease* Chicago. 1989
- 11 - Freese, W. Síndrome clínico y procedimientos de tratamiento para *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Compendio sobre Actinobacillus pleuropneumoniae*. Guadalajara México. 9-15 1990.
- 12.- Fuente de la, R., Ruiz Santa-Quiteria, J. A., Simarro, I. J. Rodríguez Ferri, E. F. Pleuropneumonia por *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Med Vet.* 5 (3) : 135-153. 1988.
- 13.- Goyette, G., Larivière, S., Mittal, K. R., Higgins, R., Martineau, G. P. Comparison of CfI, ELISA and tube agglutination test with 2-Me in pigs from herds with or without *Haemophilus pleuropneumoniae* infection. *Proc 9th IpvS Congr. Barcelona, Spain.* 1986.
- 14.- Gutiérrez, C. B., Martínez, J. M., Tascon, R. I., Rodríguez Ferri, E. F. Infección experimental en cerdos miniatura con *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Aspectos clínicos, anatomopatológicos y bacteriológicos. *Anaporc.* 94: 13-38. 1990.
- 15.- Gutiérrez, C. B., Rodríguez-Barbosa, J. I., Suarez, J., Tascon, R. I. and Rodríguez Ferri, E. F. Evaluation of an immunoperoxidase technique using an only Biotin-labeled antibody for the demonstration of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in tissue sections. *J Vet Med.* B 40. 81-86. 1993.
- 16 - Gutiérrez, C. B., Tascon, R. I., García, F. J., Vázquez, J. A., Rodríguez Ferri, E. F. Diagnóstico de la pleuropneumonia porcina. *Med Vet.* 8 (3). 1991
- 17.- Gyles, L. C. and Thoen, C. D. Pathogenesis of bacterial infections in animals. *Iowa State University Press.* Ames. Iowa. 1986.

- 18.- Hines, D. M. and Chelak, J. B. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest.* 3 101-112. 1991
- 19.- Hennessy, K. J., Iandolo, J. J. and Fenwick, B. Serotype identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by arbitrarily primed Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol.* 31 (5) : 1155-1159. 1993
- 20.- Hsu, F. S., Hu, H., Ro, L. H. Pathogenesis of pleuropneumonia in swine caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*: Pathologic, immunofluorescent and bacteriological studies. *Proc 7th Ipvvs Congr. Mexico City* 78. 1992.
- 21.- Hus, S. M., Raine, L. and Fanger, H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem.* 29. 1981.
- 22.- Ibarгойen, G. S., Perfumo, C. J., Massone, A. R., Martin, A. A., and Gimeno, E. J. The use of immunoperoxidase techniques for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in tissue sections. *Isr J Vet Med.* 45 (1)
- 23.- Inzana, T. J.: Propiedades biofísicas y de virulencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Compendio sobre Actinobacillus pleuropneumoniae. AMTEC. Guadalajara, México.* 1990.
- 24.- Inzana, T. J., Clark, G. F., Todd, J. Detection of serotype specific antibodies or capsular antigen of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by a double-labeled radioimmunoassay. *J Clin Microbiol.* 28 (2) : 312-318. 1990.
- 25.- Lallier, R., Leblanc, L., Morrissette, F. and Higgins, R. Detection of a permeability factor produced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Curr Microbiol.* 13: 141. 1987.
- 26.- Lida, J., Smith, I. M. Use of monoclonal antibodies for clasifying *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Res Vet Sci.* 49: 8-13. 1990.
- 27.- Lombin, L. H., Rosendal, S., Mitchell, W. R. Evaluation of the complement fixation test for the diagnosis of pleuropneumonia of swine caused by *Haemophilus*

- pleuropneumoniae*. *Can J Comp Med*. 46: 109-114. 1982.
- 28.-Mittal, K. R., Higgins, R., Lariviere, S. Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by indirect hemaagglutination test. *J Clin Microbiol*. 17 (5): 787-790. 1983.
- 29.- Mittal, K. R., Higgins, R., Lariviere, S. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J Clin Microbiol*. 18 (6): 1351-1354. 1983.
- 30.- Mittal, K. R., Higgins, R., Lariviere, S., Leblanc, D. A 2 Mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Am J Vet Res*. 45 (4) : 715-719. 1984.
- 31.- Mitui, T., Onaga, H., Nagasawa, Y., Nomura, Y., Kuramasu, S. Studies on *Haemophilus* infection in swine. Application of the latex agglutination test to the diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection. *Vet Microbiol*. 6: 339-349. 1981.
- 32.- Mulks, M. H., Moxon, E. R., Bricker, J., Wright, A. and Plaut, A.G.: Examination of *Haemophilus pleuropneumoniae* for immunoglobulin A protease activity. *Infect immun*. 45:276. 1984.
- 33.- Nakai, T., Horiguchi, Y., Kume, K. Monoclonal antibody based sandwich ELISA for detection of serotype specific antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Proc 11th Ipv Congr. Lausanne, Switzerland*. 2. 1990.
- 34.- Nakai, T., Horiguchi, Y., Kume, K. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *Jpn J vet Sci*. 52 (3) : 533-542. 1990.
- 35.- Negrete, A. E., Tenorio, V., Garcia, C., Godines, D., Serrano, J., Alvarez de la Cuadra, J and De la Garza, M. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Virulence and gene cloning. *Archives of medical research*. 25 (2) 229-233. 1994.
- 36.- Nielsen, R. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. Tesis doctoral. Royal Veterinary and Agricultural University of Copenhagen. 1982.

- 37.- Ohishi, K., Koeda, T., Susuki, S., Muramatsu, M. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigen by immunoperoxidase staining in pulmonary lesions of pigs inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Ann Rep Natl Vet. Assay Lab.* 24: 21-26. 1986.
- 38.- Pijoan, C. Serology and immunology of *Haemophilus pleuropneumoniae* in Schultz, R. A. *Haemophilus pleuropneumoniae* compendium. *Biotech Corporation Sds.* Avoca, Iowa. 1985.
- 39.- Pohl, S., Bertschinger, H. U., Frederiksen, W. and Mannheim, W. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica-like* organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov. on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Internat. J. Sistem. Bacteriol.* 33: 510-514. 1983.
- 40.- Sandford, S. E., Josephson, G. K. A Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae* epizootic in Southwestern Ontario: Clinical, microbiological, pathological and some epidemiological findings. *Can J Comp Med.* 45: 2-7. 1981.
- 41.- Sebunya, T. N. K., Saunders, J. R. *Haemophilus* infection in swine: A review. *JAVMA.* 182 (12): 1331-1337. 1983.
- 42.- Sternberg, L. Immunocytochemistry. 3rd Edn. *J Wiley & Sons.* New York. 1986.
- 43.- Vaillancourt, J., Martineau, G. P., Lariviere, S., Mittal, K. R., Higgins, R. Use of tube agglutination test with 2 Me for detecting piglets exposed to *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1. *Proc 9th Ipvv Congr.* Barcelona, Spain 257. 1986.
- 44.- Wilson, P. J., Falk, G., Klashinsky, S. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Can Vet J.* 28 (3): 111-116. 1987.
- 45.- Wood, G. S., and Warnke, R. Suppression of endogenous Avidin-binding activity in tissues and its relevance to Biotin-Avidin detection systems. *J Histochem Cytochem.* 29 (10): 1196-1204. 1981.

- 46.- Yolken, R. H., Geister, F J., Whitcomb, L. S., and Santoshaw, M. Enzyme immunoassay for the detection of bacterial antigens utilizing Biotin-labeled and Peroxidase Biotin-Avidin complex. *J Immunol. Methods*. 56. 1983.

**Cuadro 1.**  
**CAMBIOS ANATOMO PATOLÓGICOS DE LOS PULMONES CON LESIONES**  
**MACROSCÓPICAS Y SU RELACIÓN CON LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS**

LESIONES MACROSCÓPICAS	PULMONES AFECTADOS	NÚMERO DE AISLAMIENTOS DE <i>A. pleuropneumoniae</i> *
CONGESTIÓN	38	2
PLEURITIS	29	4
HEMORRAGIAS	21	6
CONSOLIDACIÓN	21	3
EDEMA	17	0
ADHERENCIAS	15	1
ABSCESOS	9	4

\* Una misma cepa bacteriana se puede aislar de diferentes lesiones.

**Cuadro 2.**  
**FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN DE LESIONES HISTOPATOLÓGICAS EN**  
**CORRELACIÓN CON IHQ Y AISLAMIENTO BACTERIANO**

LESIÓN MICROSCÓPICA	PULMONES CON LESIONES MACROSCÓPICAS	AISLAM POSITIVO	IHQ +	PULMONES SIN LESIONES MACROSCÓPICAS	AISLAM POSITIVO	IHQ +
Pleuroneumonía supurativa	0	0	0	2	0	2
Neumonía no supurativa	0	0	0	3	1	3
Neumonía intersticial	8	2	8	12	0	9
Pleurobronconeumonía Supurativa severa difusa	1	1	1	2	1	2
Bronconeumonía supurativa	9	2	5	5	0	3
Pleurobronconeumonía crónica	1	0	1	2	0	2
Bronquitis no supurativa	1	0	1	1	0	0
Bronquitis granulomatosa	1	0	1	1	0	1
Pleuritis no supurativa	2	0	2	0	0	0
Bronconeumonía no sup.	6	0	6	0	0	0
Bronquitis crónica	1	1	1	0	0	0
Pleurobronconeumonía no supurativa	2	0	1	0	0	0
Pleuroneumonía fibrosa	1	0	1	0	0	0
Otros	17	3	15	22	0	10
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>	<b>9</b>	<b>43</b>	<b>50</b>	<b>2</b>	<b>32</b>

+ 2 Aislamientos de zonas con hemorragias alveolares y -1 de áreas con edema

**Cuadro 3.**  
**PROTOCOLO DE INOCULACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE SUERO**  
**HIPERINMUNE CONTRA *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO I**

SEMANA	INÓCULO/ml	VÍA
1	0.75 ml <sup>1</sup>	S.C
	0.50 ml <sup>2</sup>	E.V
2	0.50 ml	E.V
3	1.00 ml	E.V
4	1.50 ml	E.V
5	2.00 ml	E.V
6	2.50 ml	E.V
7	3.00 ml	E.V
8	3.00 ml	E.V
9	3.00 ml <sup>3</sup>	E.V
10	DESCANSO <sup>4</sup>	
11	3.00 ml <sup>3</sup>	E.V
12	DESCANSO	
13	3.00 ml <sup>3</sup>	E.V
14	SANGRÍA EN BLANCO <sup>4</sup>	

<sup>1</sup> Adyuvante incompleto de Freund

<sup>2</sup> Microorganismos inactivados

<sup>3</sup> Microorganismos vivos

<sup>4</sup> Sangrado y Titulación

Cuadro 4.

**RESULTADOS DEL AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO Y DE IHQ DE  
ACUERDO A SU PROCEDENCIA GEOGRÁFICA**

ORIGEN	PULMONES CON LESIONES	AISL. +	IHQ +	PULMONES SIN LESIONES	AISL. +	IHQ +
QUERÉTARO	21	1	19	4	0	2
JALISCO	8	1	8	0	0	0
EDO. DE MÉXICO	19	7	15	24	2	16
SONORA	2	0	1	22	0	14
TOTAL	50	9	43	50	2	32

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

29

Cuadro 5.  
TABLA DE CONTINGENCIA

	+	-	TOTAL
IHQ	75	25	100
% RENGLON	75 %	25 %	
% COLUMNA	87.21 %	21.93 %	
AI SL.	11	89	100
% RENGLON	11 %	89 %	
% COLUMNA	12.79 %	78.07 %	
TOTAL	86	114	200
%	43 %	57 %	

**ANÁLISIS DE TABLA DE CONTINGENCIA**

**JI-CUADRADA TOTAL = 83.558 P ≤ 0.001**

**G ESTADÍSTICA = 91.556**

**COEFICIENTE DE CONTINGENCIA = 0.543**

**VALOR DE JI-CUADRADA CON CORRECCIÓN DE CONTINUIDAD = 80.967**

**P ≤ 0.001**



**Figura 1. PULMÓN SIN LESIONES MACROSCÓPICAS APARENTES**



**Figura 2. PULMÓN CON LESIONES MACROSCÓPICAS DE NEUMONÍA  
ABSCEDATIVA**

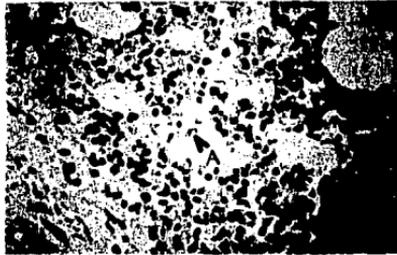


Figura 3. Corte de pulmón positivo (>) *A. pleuropneumoniae*, en la luz alveolar empleando la técnica de ABC-P contrastada con hematoxilina. 10X

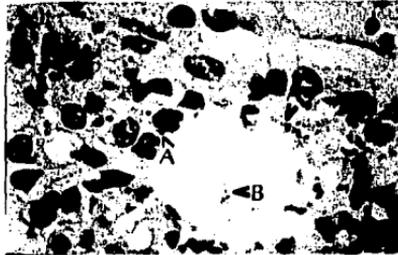


Figura 4. Corte de pulmón que presenta reacción positiva a nivel intracelular (A) como en la luz alveolar (B). Técnica ABC-P contrastada con hematoxilina. 25X.

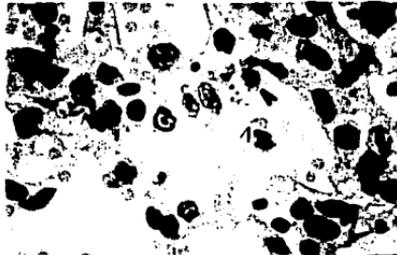


Figura 5. Detalle de un caso positivo a *A. pleuropneumoniae* a nivel de macrófago (>). Técnica ABC-P contrastada con hematoxilina. 60X.